ESTRATTO
dall'
Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia
Vol. X. — Fasc. 4.
Firenze — 1911.

Dall' Istituto anatomico della R. Università di Sassari
diretto dal Prof. G. Levi

Studî sulla grandezza delle cellule

II. — Le variazioni dell'indice plasmatico-nucleare durante l'intercinesi

di

Giuseppe Levi e Tullio Terni

Con una tavola nel testo.



DITTA EDITRICE LUIGI NICCOLAI
FIRENZE
1911

Dall' Istituto anatomico della R. Università di Sassari
diretto dal Prof. G. Levi

Studî sulla grandezza delle cellule

II. — Le variazioni dell'indice plasmatico-nucleare durante l'intercinesi

di

Giuseppe Levi e Tullio Terni

Con una tavola nel testo.

L'aumento di volume della cellula nel periodo che intercede fra la telofase di una divisione e la profase della divisione successiva rappresenta, secondo la legge di Spencer, lo stimolo alla divisione ed è per conseguenza una delle condizioni che contribuiscono nella serie delle generazioni cellulari a mantenere relativamente costante la grandezza delle cellule; ma ben poco sappiamo sulle modalità di quest'accrescimento. L'ipotesi di Spencer presuppone che esso sia progressivo e graduale durante tutta l'intercinesi, raggiungendo il suo massimo alla fine di questo periodo.

In quanto al rapporto fra aumento del corpo cellulare ed aumento del nucleo nell'intercinesi, Strassburger (11, 1893) per il primo ha affermato che il citoplasma s'accresce in misura maggiore del nucleo; ed anzi la cellula si dividerebbe quando l'accrescimento del suo citoplasma sorpassa un certo punto, che presumibilmente segna il limite della sfera d'azione del nucleo; colla divisione cellulare si ristabilirebbe il rapporto normale.

Si accostano sino ad un certo punto all'ipotesi di Strassburger le idee di Richard Hertwig sull'importanza del rapporto plasmatico-nucleare nella divisione cellulare; e sotto l'impulso di quelle idee fu nell'Istituto zoologico di Monaco analizzato profondamente il comportamento del nucleo e del citoplasma nel periodo di riposo delle cellule.

La teoria di RICHARD HERTWIG (6, 1903, 7, 1908) dà, come quella di SPENCER, molta importanza al metabolismo come fattore della divisione cellulare; ma il fenomeno sarebbe determinato principalmente dalla sproporzione fra l'accrescimento del corpo cellulare e quello del nucleo. Nel periodo che succede immediatamente ad una divisione, massa citoplasmatica e massa nucleare sono in equilibrio vicendevole (fase della norma plasmatico-nucleare), ma non appena, in seguito a processi assimilativi, la massa del protoplasma aumenta, il nucleo non segue l'accrescimento del primo; e la sproporzione fra il volume del nucleo e quello del citoplasma si fa sempre maggiore sino ad una fase che R. HERTWIG definisce di « tensione plasmatico-nucleare (Kernplasma-Spannung) », nella quale la cellula ha raggiunto il grado di tensione necessario ad una nuova divisione. Da questo momento s'inizia un rapido aumento della massa nucleare a spese del citoplasma, finchè, immediatamente prima della divisione, si ristabilisce la norma plasmatico-nucleare.

I fatti sui quali quest'interessante ipotesi si fonda, riguardano quasi esclusivamente i Protisti; ricordo in particolar modo la ricerca di POPOFF sovra un Infusorio (*Frontonia leucas*).

CONKLIN (4, 1912) ha svolto un vasto ed importante gruppo di ricerche nelle uova in segmentazione di *Crepidula* e di *Fulgur* collo scopo di studiare il rapporto plasmatico-nucleare e la sua importanza nella divisione cellulare.

Limitandoci a riferire i risultati di quest' A. che riguardano più davvicino il nostro argomento, nelle uova di *Crepidula* non si avrebbe la diminuzione di volume del nucleo successiva alla divisione osservata da POPOFF (10, 1908), bensi il minimum di volume nucleare si osserverebbe nell'anafasi, prima della divisione del corpo cellulare. Inoltre il rapporto plasmatico-nucleare varia nei differenti blastomeri ed a stadî differenti, ed esso dipende principalmente dalla durata dell'intercinesi; quando il periodo di riposo è estremamente lungo, la maggior parte del citoplasma è sostituita dal nucleo; CONKLIN propende a considerare le variazioni del rapporto plasmatico-nucleare piuttosto come un risultato che come una causa della divisione cellulare e perciò esso sarebbe molto variabile. La grandezza del nucleo in ciascuna specie dipenderebbe dai seguenti tre fattori: numero dei cromosomi, volume del citoplasma e lunghezza del periodo di riposo.

Non esistono altre ricerche nei Metazoi sull'argomento che

c'interessa. Invero i fatti di dominio comune nei Vertebrati mal s'accordano coll'ipotesi di R. HERTWIG; nelle cellule embrionali, e specialmente in quelle che attivamente si riproducono, l'accrescimento del citoplasma è limitatissimo in confronto al volume del nucleo.

Inoltre negli elementi labili di Anfibî Urodeli, i quali pure si dividono di frequente, si nota un'analoga sproporzione fra protoplasma e nucleo. R. HERTWIG stesso rimase colpito da questo fatto nell'esaminare dei tessuti di *Proteus* e l'attribuì alla bassa temperatura alla quale quella specie vive; si avrebbero in tale caso, secondo HERTWIG, condizioni analoghe a quelle dei Protozoi tenuti al freddo. Ma noi potremmo obiettare che la stessa sproporzione, per nostra esperienza, è apprezzabile in altri Urodeli terrestri di paesi temperati (*Salamandrina perspicillata, Geotriton fuscus*).

Se finora le ricerche dirette a stabilire per i Metazoi l'attendibilità dell'ipotesi di R. HERTWIG furono così poco numerose, ciò dipende verisimilmente da difficoltà d' ordine pratico, poichè nella maggioranza dei casi è quasi impossibile di seriare con esattezza le cellule di un determinato tipo durante le varie fasi dell' intercinesi.

Gli spermatociti di 1° ordine (auxociti) degli Urodeli nel lungo periodo che trascorre fra l'ultima divisione spermatogoniale e la 1ª divisione di maturazione sono certo molto adatti per la soluzione del problema suaccennato; ed in particolar modo nel testicolo di *Geotriton fuscus* noi abbiamo trovato condizioni eccezionalmente favorevoli; poichè in quest'organo, come fu dimostrato recentemente da uno di noi (12, 1911) « esiste un'onda d'evoluzione che si propaga dall'avanti all' indietro; essa vale per tutti i varî elementi sessuali del periodo spermatocitogenetico e spermatoistogenetico presenti in uno stesso testicolo ed è apprezzabile in qualunque periodo dell'anno la si ricerchi ».

Inoltre gli auxociti del *Geotriton* hanno nel nucleo caratteri talmente spiccati in ciascuna fase della loro evoluzione, che nessun dubbio può sussistere sulla loro seriazione.

Noi abbiamo potuto distinguere 5 stadî durante l' accrescimento dell'auxocita e per ciascuna di queste fasi furono eseguite numerose misurazioni del corpo cellulare e del nucleo. Sarebbe stato desiderabile di prender punto di partenza nelle misurazioni dell'auxocita dalla telofasi dell'ultima cinesi spermatogoniale, ma

questo non fu fatto per l'impossibilità di stabilire quale fra le cinesi spermatogoniali sia veramente l'ultima.

Furono misurati anche gli spermatociti di 2° ordine e gli spermatidi per alcuni confronti di cui diremo; i risultati riguardanti le fasi degli spermatociti di 2° ordine sono alquanto approssimativi, perchè la forma poliedrica degli elementi in mitosi ne rende ardua la misurazione.

Non ci diffonderemo sulla tecnica delle misurazioni, essendoci attenuti agli identici criterî seguiti da uno di noi in una precedente ricerca fondata su dati citometrici (8,1906); anche questa volta furono calcolate le superfici dai diametri medî ottenuti colla misurazione di numerosissime cellule; le cellule e i nuclei furono misurati come elissi. Le cifre ottenute furono quì riprodotte col metodo grafico seriale.

Per quel che riguarda la costruzione della curva dell'accrescimento del protoplasma e del nucleo dell'auxocita, dato che la scelta delle varie fasi per le misurazioni fu puramente arbitraria e tenendo conto anche del fatto che l'accrescimento dell'auxocita non avviene uniformemente in tutti i periodi, sarebbe stato un grave errore il disporre sull'ascissa le varie fasi ad intervalli fra loro eguali.

Noi sappiamo che le trasformazioni dell'auxocita, come di tutti gli altri elementi seminali di *Geotriton*, si svolgono con grande regolarità, per modo che ciascuna fase che caratterizza la sua evoluzione corrisponde con una certa approssimazione ad un'epoca determinata dell'anno; perciò ci fu possibile di tener conto del numero dei giorni che decorrono fra i varî stadî dell'evoluzione dell'auxocita e di seriare queste cifre sull'ascissa.

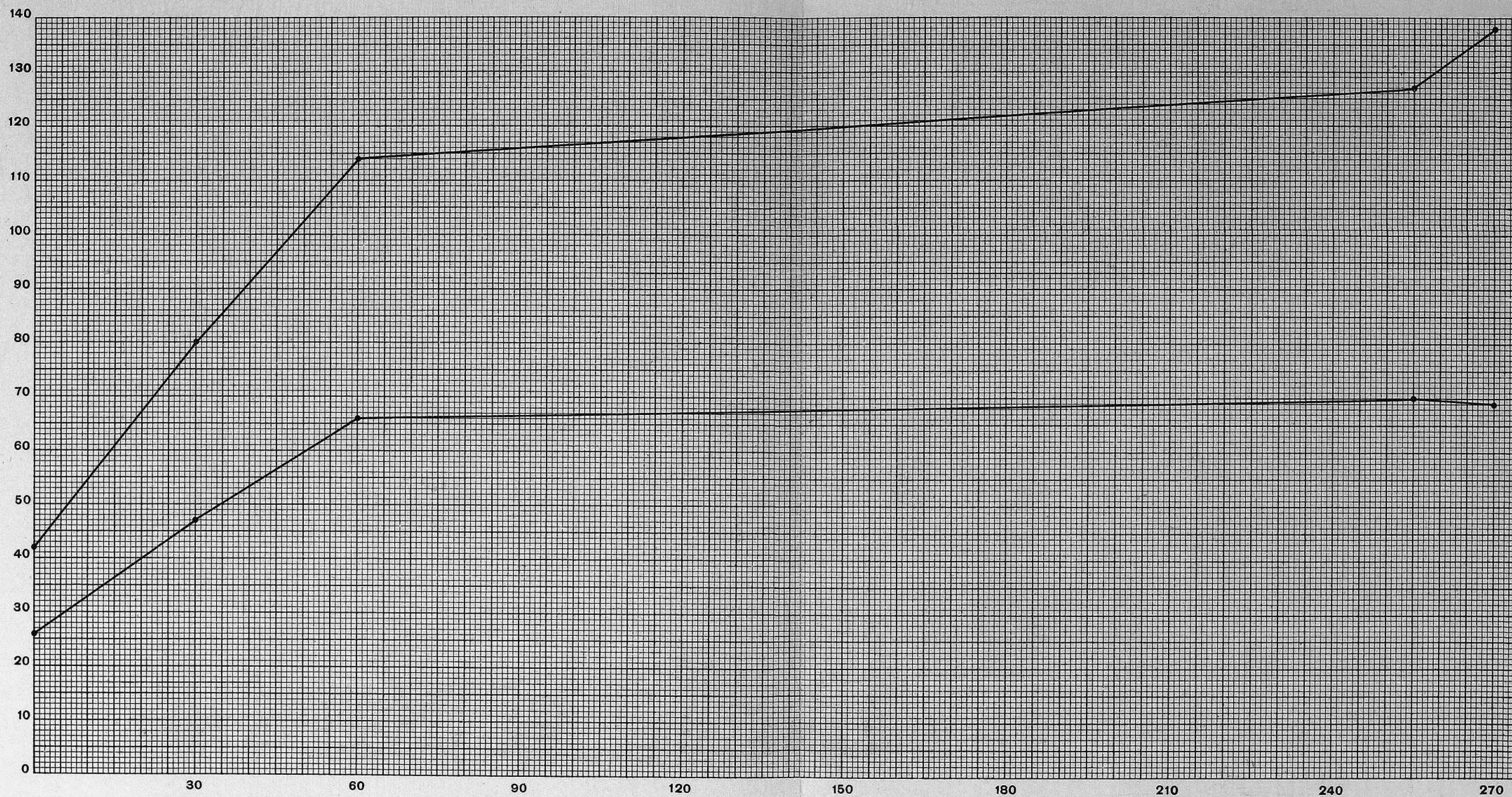
Per poter seriare con relativa esattezza le singole date corrispondenti alle varie tappe dall'evoluzione dell'auxocita, si tenne conto del primo apparire al polo testicolare anteriore di una determinata forma nucleare (1).

I numeri dell'ordinata indicano il coefficiente grandezza del

---

(1) L'epoca di comparsa delle varie forme nucleari non è la stessa in tutte le annate e tali variazioni possono anche essere abbastanza notevoli; le date qui riportate si riferiscono all'anno 1908-1909.

Riguardo alle differenze regionali nel ciclo spermatogenetico di *Geotriton* rimandiamo il lettore alla nota a pag. 10 della pubblicazione già citata da Terni (12,1911).



Curva di accrescimento

del corpo cellulare (linea superiore) e del nucleo (linea inferiore)

dell' auxocita di Geotriton fuscus.

Firenze, Lit. A. Ruffoni, Piazza S. Croce 20

l'auxocita (1 mill. = 10 μ^2), i numeri dell'ascissa indicano il coefficiente tempo (espresso in giorni). Le variazioni dell' indice plasmatico nucleare sono rilevabili dall'annessa tabella (1).

STADIO DI SVILUPPO	Epoca dell'anno	Grandezza del corpo cellulare (in μ^2)	Grandezza del nucleo (in μ^2)	Indice plasmatico-nucleare
Auxocita, poco dopo l' ultima cinesi somatica	15 Agosto	420	255	1,65
Auxocita a filamenti cromatici sottili	15 Settembr.	799	471	1,69
Auxocita ad anse cromatiche spesse (bivalenti) orientate verso la sfera.	15 Ottobre	1140	658	1,73
Auxocita nel quale si effettua la scissione longitudinale dei cromosomi.	1 Maggio	1270	700	1,81
Auxocita nello stadio cosiddetto di tensione nucleare	15 Maggio	1382	688	2
Telofasi inoltrata della I^a^ divisione di maturazione		682	277	2,46
Spermatocita del II° ordine, poco prima della profasi della II^a^ divisione di maturazione		689	363	1,89
Telofasi inoltrata della II^a^ divisione di maturazione		390	135	2,89
Spermatide subito dopo la ricostituzione dell'impalcatura nucleare		320	228	1,4

Dall'esame della curva si rileva anzitutto che l'accrescimento dell'auxocita non avviene in maniera uniforme; abbastanza rapido

(1) L'indice plasmatico-nucleare fu calcolato seguendo lo stesso criterio che nelle ricerche già citate dal Levi, di dividere la cifra che esprime la grandezza della cellula per quello che esprime la grandezza del nucleo. — Conklin si attiene in sostanza allo stesso criterio, ma anzichè calcolare la superficie di sezione della cellula, ne ricerca il volume e poi sottrae dal totale della cellula il volume del nucleo; poi per stabilire l'indice plasmatico-nucleare divide la cifra ottenuta per il volume del nucleo.

Trattandosi di dati che hanno un valore puramente relativo, queste differenze nel calcolo dell'indice plasmatico-nucleare non hanno veruna importanza per il risultato definitivo.

alla fine dell'estate ed al principio dell'autunno, diviene più lento nel lungo periodo che intercede fra l'Ottobre ed il Maggio e che precede la divisione longitudinale dei cromosomi bivalenti; tale accrescimento si accentua di nuovo nel breve periodo fra la divisione longitudinale dei cromosomi bivalenti e la fase di tensione nucleare.

In quanto all' aumento di grandezza del nucleo, esso è inferiore a quello del citoplasma; e la sproporzione nell' accrescimento dei due organi è chiaramente indicata dalla distanza sempre maggiore che separa le due curve e dalla cifra sempre più elevata che l'indice plasmatico-nucleare raggiunge nelle varie fasi (vedi tabella).

Noi vediamo poi che nella fase che precede immediatamente la divisione di maturazione, la sproporzione fra grandezza del nucleo e grandezza della cellula si accentua, proprio il contrario di quanto Popoff ha osservato in *Frontonia:* anzi si osserverebbe una diminuzione assoluta, per quanto lieve, nella grandezza del nucleo (1).

Gli spermatociti di 2° ordine ed il loro nucleo sono precisamente della metà più piccoli degli auxociti al termine del periodo di accrescimento.

Nella telofasi delle due divisioni di maturazione, subito dopo la ricostituzione della membrana nucleare, il nucleo ha un volume piccolissimo (indice plasmatico-nucleare 2,46 e 2,89), in accordo con quanto Conklin ha osservato.

Data la brevità del periodo di riposo, non siamo in grado di stabilire con esattezza come varî il nucleo durante l' intercinesi fra la 1ª e la 2ª divisione di maturazione; ma la cifra elevata dell' indice plasmatico-nucleare nella fase che precede immediatamente la 2ª cinesi, ci permette di supporre che le variazioni dell' indice suddetto non siano molto diverse da quelle rilevate nell' auxocita.

Un fatto indiscutibile emerge adunque dalle nostre ricerche: che durante tutto il periodo auxocitario vi è una sproporzione

---

(1) Janssens (La Cellule, T. 22) eseguì, indipendentemente dall' ipotesi di R. Hertwig, delle misurazioni sui nuclei degli elementi del periodo spermatocitogenetico di Batrachoseps, ottenendo risultati che s'accordano perfettamente coi nostri; è notevole soprattutto l'arresto nell'accrescimento del nucleo nella fase che precede immediatamente la mitosi.

uniformente crescente fra il volume del citoplasma e quello del nucleo, e che questa s'accentua particolarmente nel periodo che precede immediatamente la cinesi, mentre secondo l' ipotesi di HERTWIG quella fase avrebbe dovuto essere segnata da un rapido aumento della massa nucleare, per mezzo del quale si sarebbe ripristinata la norma plasmatico-nucleare.

Nella telofasi della divisione, secondo le osservazioni nostre concordanti con quelle di CONKLIN, la sproporzione suaccennata è anche maggiore che nella profasi, ma in un periodo immediatamente successivo il volume del nucleo cresce con grande rapidità e così la norma plasmatico-nucleare si ristabilisce.

Il comportamento dell'auxocita di Geotriton s'accorda adunque con quanto STRASSBURGER ha osservato nelle cellule vegetali, piuttosto che coi risultati di HERTWIG e dei suoi allievi nei Protisti. E tenendo poi conto delle osservazioni già riferite di CONKLIN, pure discordanti da quelle di HERTWIG, possiamo concludere che l'ipotesi di R. HERTWIG, nei termini nei quali è stata formulata, potrà spiegare qualche caso particolare di divisione ma non può avere una portata generale.

Forse nè R. HERTWIG nè STRASSBURGER tennero il debito conto delle trasformazioni apprezzabili nell' interno del nucleo durante l' intercinesi, che nel nostro caso sono di gran lunga più evidenti che nelle cinesi somatiche.

Il solo Autore il quale abbia dato importanza alle variazioni nella quantità della cromatina durante l' intercinesi come causa della mitosi è BOVERI (2, 1904; 3, 1905); il principio fondamentale al quale l' ipotesi di BOVERI è informata, è la legge notissima, che la grandezza della cellula è una funzione del numero dei cromosomi che il suo nucleo contiene; legge fondata su numerose ed importantissime esperienze e che viene universalmente accettata.

Molto più ipotetica è la parte della teoria di BOVERI riguardante la cinesi; la causa determinante questo fenomeno sarebbe l'aumento di volume dei cromosomi alla fine dell' intercinesi. Dalle ricerche di MARCUS (9, 1906), di ERDMANN (5, 1908) e di BALTZER (1, 1908) risulta invece che durante l' intercinesi anzichè un aumento, si ha una diminuzione nel volume dei cromosomi.

Negli auxociti, elementi che si preparano ad una divisione riduttiva, un raddoppiamento di numero dei cromosomi deve essere assolutamente escluso; in quanto all'aumento del loro vo-

lume, Janssens ha invero affermato che negli auxociti di *Batrachoseps,* i cromosomi raggiungono alla fine del periodo di accrescimento un volume doppio di quello che essi avevano all' inizio. Ma le difficoltà che si oppongono alla misurazione dei cromosomi sono a nostro avviso tali, che non ci crediamo autorizzati ad affermare se tale aumento realmente avvenga o no. Ed ad ogni modo esso non avrebbe alcun valore per l' ipotesi di Boveri, perchè nel periodo auxocitario ha luogo più che un aumento reale nella quantità della basicromatina una modificazione nella sua distribuzione; noi sappiamo che questo periodo è caratterizzato da una progressiva concentrazione della basicromatina, la quale all' inizio è in parte diffusa o raccolta in grosse zolle e che col crescere di volume della cellula si concentra sempre più nei cromosomi.

La cromatina alla fine del periodo auxocitario non è dunque aumentata in quantità, ma si presenta sotto forma diversa di quella che essa aveva in origine.

E noi siamo profondamente convinti che lo scarso accrescimento del nucleo, e sopratutto l'arresto di questo accrescimento, che abbiamo notato alla fine del periodo auxocitario, sia intimamente collegato al fenomeno della concentrazione della cromatina; e tale fenomeno è certamente accompagnato da un passaggio di succo nucleare e di altri materiali disciolti, dal nucleo nel citoplasma.

Che il volume del nucleo sia in stretta dipendenza dalla forma e dalla distribuzione della cromatina, è indicato anche dal fatto, su cui insistemmo digià, che nello spermatocita di 2° ordine, nel quale, per la brevità del periodo di riposo, la cromatina anzichè diffondersi nel nucleo rimane concentrata nei cromosomi, l' indice plasmatico-nucleare si mantiene elevato; e così ci rendiamo parimente conto dell'elevato indice pl. n. osservato nella telofasi tanto della 1ª che della 2ª divisione di maturazione, quando il nucleo è costituito quasi esclusivamente da cromatina.

Una riprova della verosimiglianza della nostra supposizione, che allo scarso accrescimento del nucleo dell'auxocita non sia estranea la concentrazione della cromatiua nei cromosomi, l' abbiamo in quanto è stato osservato da Born, da Lubosch e da Levi negli oociti di Anfibî durante il periodo di accrescimento; anche in questi elementi, nei quali tale periodo è caratterizzato da una progressiva concentrazione della cromatina nei cromosomi, l'aumento di volume della vescicola germinativa è di gran lunga

minore di quello del corpo cellulare; per quanto non sia stato da noi calcolato sistematicamente l' indice plasmatico-nucleare negli oociti, un esame anche superficiale dei vecchi preparati di oociti di *Salamandrina perspicillata* di LEVI, ci ha convinto che le variazioni dell'indice plasmatico-nucleare durante il periodo d'accrescimento sono di gran lunga più elevate che negli auxociti di Geotriton; ed è poi troppo noto che nella profase della prima divisione di maturazione, quando la cromatina dell'oocita è in totalità raccolta nei cromosomi, il volume del nucleo si riduce enormemente.

Forse l'ipotesi di R. HERTWIG potrebbe essere modificata nel senso seguente: la norma plasmatico-nucleare si raggiungerebbe alla fine della cinesi, quando il nucleo si imbeve di succo nucleare per trasformazione di materiali assunti dal citoplasma e quando l'impalcatura nucleare si ricostituisce. Ma la fase di norma pl. n. è brevissima, perchè non appena il volume della cellula aumenta, s'inizia nel nucleo la concentrazione della cromatina ed un passaggio di succo nucleare dal nucleo nel citoplasma; in conseguenza di tale fenomeno l'accrescimento del nucleo viene ad essere molto minore di quello del corpo cellulare; si ha così la tensione plasmatico-nucleare, che va progressivamente crescendo sino alla fine dell' intercinesi, di pari passo alla concentrazione della cromatina nei cromosomi; soltanto dopo il ritorno delle due cellule figlie allo stato di riposo e soltanto dopo la ricostituzione dell' impalcatara nucleare, la tensione pl. n. decresce e si ha il ritorno alla norma.

Pur ritenendo adunque che allo stabilirsi della tensione plasmatico-nucleare non sia estranea la concentrazione della cromatina, che caratterizza specialmente la fine dell' intercinesi, non escludiamo che la tensione stessa possa contribuire alla liberazione di energia che la mitosi richiede.

Noi siamo ad ogni modo convinti, che questo fattore non possa avere che un'importanza subordinata nel determinare la cinesi, e che la causa principale del fenomeno sia sempre quella supposta da SPENCER: le condizioni sfavorevoli nelle quali la nutrizione della cellula viene a trovarsi in seguito alla sproporzione esistente, per ragioni geometriche ovvie, fra l'aumento della sua massa e quello della sua superficie, costituirebbero un impedimento all'aumento della cellula oltre un certo limite e nello stesso tempo lo stimolo alla sua divisione.

INDICAZIONI BIBLIOGRAFICHE

(1) Baltzer F. 1908. — Die Chromosomen von Strongylocentrotus lividus und Echinus microtuberculatus. — *Arch. f. Zellforschung, Bd. 2.*

(2) Boveri Th. 1904. — Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. — *Jena.*

(3) Id. 1905. — Zellenstudien, 5. — Ueber die Abhängigkeit der Kerngrösse und Zellenzahl der Ausgangzellen. — *Jena.*

(4) Conklin E. G. 1912. — Cell size and nuclear size. — *Joun. of exp. Zool. Vol. 12, N. 1.*

(5) Erdmann Rh. 1908. — Experimentelle Untersuchungen der Massenverhältnisse von Plasma Kern und Chromosomen in dem sich entwickelenden Seeigelei. — *Arch. f. Zellforschung. Bd. 2, F. 1.*

(6) Hertwig R. 1903. — Ueber Korrelation von Zell und Kerngrösse und ihre Bedeutung für die geschlechtliche Differenzierung und die Teilung der Zelle. — *Biol. Centralbl. Bd. 22.*

(7) Id. 1908. — Ueber neue Probleme der Zellenlehre. — *Arch. f. Zellforschung Bd. 1.*

(8) Levi G. 1908. — Studî sulla grandezza delle cellule. I. Ricerche comparative sul volume delle cellule dei Mammiferi. — *Arch. ital. di Anat. e di Embriol. Vol. 5, F. 2.*

(9) Marcus H. 1906. — Ueber die Wirkung der Temperatur auf die Furchung der Seeigeleier. — *Arch. f. Entw. mech. Bd. 22.*

(10) Popoff M. 1908. — Experimentelle cytologische Studien. — *Arch. f. Zellforschung. Bd. 1.*

(11) Strassburger E. 1893. — Ueber die Wirkungsphäre der Kerne und die Zellgrösse. — *Histologische Beitrage Bd. 5.*

(12) Terni T. 1911. — La spermatogenesi del Geotriton fuscus. — *Arch. ital. di Anat. e di Embriol. Vol. 10 F. 1.*

L'Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia si pubblicherà in quattro fascicoli che formeranno ogni anno un volume di pagine 800 con illustrazioni e con tavole.

Il prezzo annuo di abbonamento è:

Per l'Italia L. 30.—

Per l'Estero Fr. 31.50 comprese le spese di spedizione.

Prezzo di un Fascicolo separato L. 15. Per l'Estero aggiungere le spese di posta.

Per quanto riguarda la Direzione rivolgersi al Prof. G. CHIARUGI, Istituto Anatomico, Via Alfani 33, FIRENZE.

Per quanto riguarda l'Amministrazione dirigersi alla Ditta LUIGI NICCOLAI, Editore, Via Faenza 44, FIRENZE.